

自身の酵素分解生成物が分解を加速するヒドロゲルの開発と バイオマテリアルへの応用

Development of Enzymatically-degradable Hydrogel Accelerated by Enzymatic Decomposition Product for Application to Biomaterials

大阪大学大学院基礎工学研究科物質創成専攻化学工学領域 助教 中畑 雅樹
Department of Engineering Science, Osaka University, Masaki Nakahata

要旨

本研究では、再生医療のための三次元組織構築に有用な、細胞の伸展スペースを確保するための犠牲材料への応用を見越して、穏和な条件で即座に分解可能なヒドロゲルの開発を目指した。そのためのアプローチとして「酵素による分解で生じる低分子が自己分解を加速するヒドロゲル」を提案し、その設計・合成に取り組んだ。アミラーゼで分解可能なアミロペクチンに化学修飾を施し水溶性を向上させた。この水溶液中でボロン酸ペンダント部位を含む合成高分子を重合することで、ボロン酸エステル結合により架橋された透明度の高いヒドロゲルを得た。粘弾性測定により材料の力学特性を評価した。得られたヒドロゲルのアミラーゼによる分解性を評価したところ、 \sim cm サイズのバルクゲルを 1 時間以内に完全分解することが可能であった。本研究を通して、迅速に分解するヒドロゲルの新たな設計指針を示し、再生医療への応用のための基盤を築くことができた。

1. はじめに

移植医療に代わる新たな医療として、生体外で作製した人工臓器や組織を移植して治療する再生医療の技術開発が急務である。中でも、細胞を適切な位置・環境に配置した、厚みのあるヒドロゲル状の三次元構造物を簡便・大量に作製する手法が求められている。材料中に埋め込んだ細胞を効率よく組織へと成長させるためには、①細胞の足場となる材料の中に②細胞共存下で分解可能な材料を混合しておき、後から②を分解することで細胞への酸素・栄養分の供給や伸展・増殖のためのスペースを確保することが有効である (図 1 上)。しかし、材料の形成から分解までを素早く行わなければ、細胞に酸素や栄養分が行き渡らない時間が長くなり、組織の壊死を招いてしまう。このため、細胞に対して穏和な条件で即座に分解できる材料の開発が課題となっている。

細胞に対して穏和な刺激の一つとして、酵素反応が挙げられる。酵素により分解可能な高分子材料としてこれまでに様々なものが提案されており[1]、バイオメディカル材料への応用が期待されているが、生体内で材料を用いる場合はその使用後の分解までを考慮に入れる必要がある。形成・使用・分解の全てのプロセスに渡る時空間的な生体適合性を全て保証して初めて真に「生体適合性がある」と言えるが、このような観点で見ると真に生体適合性のあるプロセスは決して多くない。

申請者はこの課題に対して、「酵素による分解で生じた低分子が自己分解を加速するヒドロゲル」を用いるというアプローチを着想した。多くの天然高分子には対応する分解酵素が存在し、分解によって糖やアミノ酸などの低分子を生じる。ここで、生じた低分子によって競争的に阻害されるような分子間相互作用をゲルの架

橋に用いれば、酵素反応により生じた分解生成物が脱架橋を進行させ、ゲルの分解が加速度的に起こるのではないかと考えた (図 1 下)。

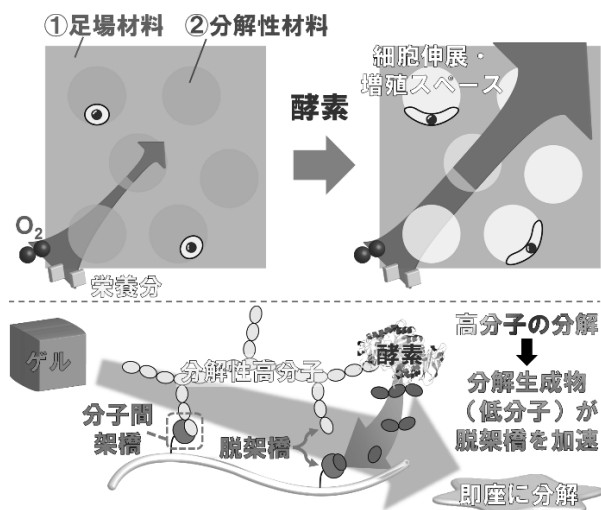


図 1. 本研究の概念図。

本研究では特に、分解性高分子としてデンプンの成分であるアミロペクチン (AP)、その架橋剤として種々のビニルモノマーの重合により合成される高分子、架橋に用いる分子間相互作用としてボロン酸エステル結合を選択した。ボロン酸は糖をはじめとするジオール類と可逆的な結合を形成することが知られている (図 2)。本系では特に、アミロペクチンの酵素分解によりオリゴ糖や単糖が生じ、ボロン酸修飾合成高分子へ競争的に結合することで架橋が消失し分解するヒドロゲルの開発を目的とした。

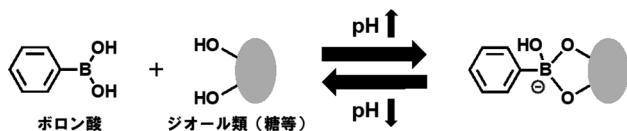


図 2. ボロン酸-ジオール類の相互作用。

2. 実験方法

2-1. アミロペクチンの水溶化

酵素分解性高分子として、市販のトウモロコシ由来アミロペクチンを用いた。アミロペクチンはそれ自体では水溶性に乏しく扱いはら

め、水溶性を向上させるためにカルボキシメチル基を修飾し、カルボキシメチルアミロペクチン (CMAP) とした (図 3)。高分子のキャラクターゼーションおよび水溶性の評価を、IR、UV-Vis、NMR スペクトルにより行った。

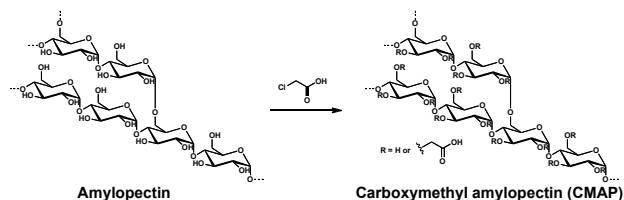


図 3. カルボキシメチルアミロペクチン (CMAP) の合成。

2-2. CMAP 共存下でのボロン酸修飾合成高分子の重合

CMAP の水溶液中でボロン酸修飾モノマーおよび種々の水溶性ビニルモノマーの共重合を行った (図 4)。これによるゲル形成の可否を調査した。

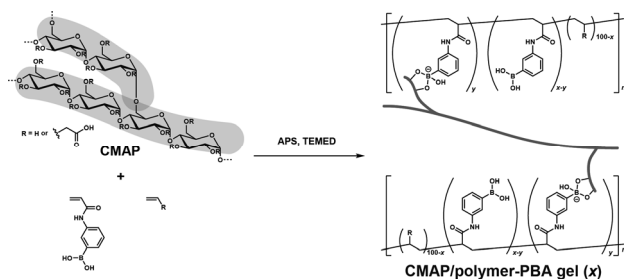


図 4. CMAP 共存下での重合によるゲルの調製。

2-3. 材料の力学特性の評価

2-2 のうちゲル化したものについて、平行円盤型レオメーターを用いた動的粘弾性測定により材料のレオロジー特性を評価した。

2-4. 材料の分解性の評価

2-2 で得られたゲルについて、アミロペクチンを分解する酵素であるアミラーゼを作用させ、その分解性を評価した。比較として、酵素を作用させない条件でも実験を行った。

3. 結果と考察

3-1. アミロペクチンの水溶化

まず図 3 に示すように、アミロペクチンにクロロ酢酸を作用させることでヒドロキシ基の一部にカルボキシメチル基を修飾した。修飾前後での IR スペクトルを測定したところ、カルボニル基由来の吸収の増大が観測され、修飾反応の進行を確認した (図 5)。実際に水溶性が劇的に向上し、水溶液として扱うことができるようになった (図 6a) ため、以降の実験では CMAP を使用した。

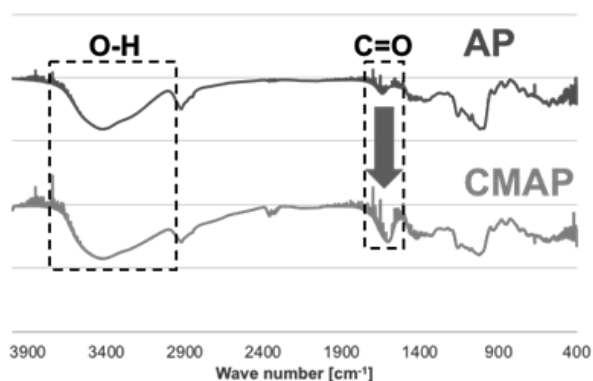


図 5. AP および CMAP の IR スペクトル。

3-2. CMAP 共存下でのボロン酸修飾合成高分子の重合

次に、CMAP の共存下でボロン酸モノマーと水溶性ビニルモノマーの共重合を行った。例としてアクリルアミドを用いた場合の写真を図 6b に示す。重合により系は溶媒である水を含んだまま固化し、ヒドロゲルが形成された。AP の懸濁液中で同様に重合反応を行ったところ、一部水に溶けた高分子が架橋されたと思われるヒドロゲル状の材料が形成されたが、溶け残った AP を多量に含んでいるためゲルは不透明であった。これに比べて水溶性の向上した CMAP を用いた場合は、透明度の高いゲルが形成されることが分かった。

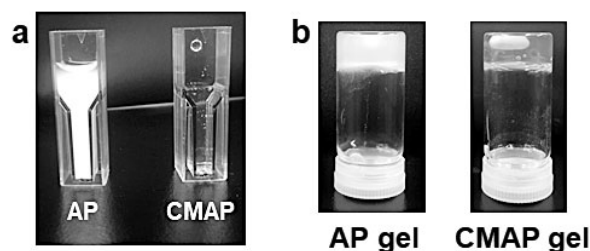


図 6. AP および CMAP の濃度が 5 w/v% となるように水を加えた際の写真 (a)、AP もしくは CMAP の共存下でボロン酸モノマーとアクリルアミドの共重合を行ったサンプルの写真 (b)。

3-3. 材料の力学特性の評価

得られた材料の力学特性を評価するため、レオメーターによる動的粘弾性測定を行った。CMAP を用いたゲルの測定波形の一例を図 7 に示す。材料の弾性的性質を示す貯蔵弾性率 G' が材料の粘性的性質を示す損失弾性率 G'' を測定周波数領域において上回っており、ゲル様の力学特性を示しているといえる。 G' および G'' には弱い周波数依存性が見られ、高周波数領域においては緩やかな緩和のような挙動が見られた。これは、ボロン酸-糖の間での可逆的な結合により架橋された本材料の特性を反映していると考えられる。マクロレベルで見ると顕著な流動性は観察されなかったため、構造材料としてはいささか弱いものの、犠牲材料として必要な力学特性を満たしていると考えられる。

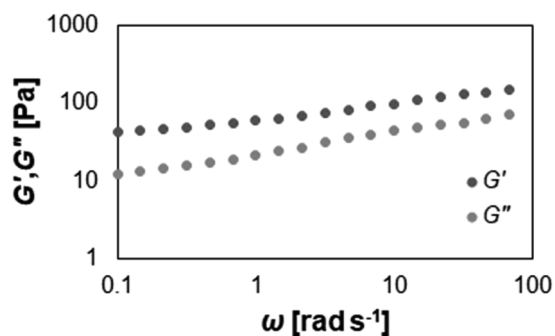


図 7. CMAP ゲルの G' , G'' の周波数依存性。

3-4. 材料の分解性の評価

最後に、得られた材料の分解性を評価した。ここでは穏和な刺激として、生体内に存在する消化酵素であるアミラーゼによりアミロペクチン部分を分解することでゲルの分解を試みた。アミラーゼを含む buffer および含まない buffer 中に得られたゲルを浸漬し経時変化を観察したところ、アミラーゼを含む buffer 中ではゲルが1時間以内に完全に分解されたのに対し、含まないものでは1時間後もゲルが形を保っており、顕著な差が見られた (図 8)。アミラーゼによってアミロペクチン部分が分解され、生じた低分子の糖が材料の架橋を形成するボロン酸エステル結合を競争的に切断することで分解が促進されたものと考えている。

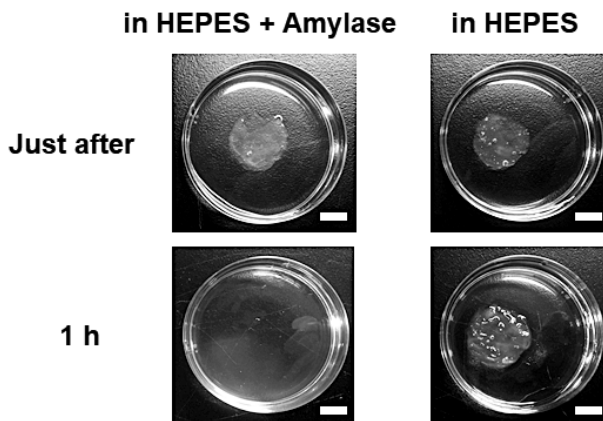


図 8. アミラーゼを含む HEPES buffer および含まない buffer 中での CMAP ゲルの経時変化を示した写真。(スケールバー : 1 cm)

以上のように、現象論的な報告には留まるが、cm スケールのゲルを1時間以内に分解することに成功した。一般的に、止血後に壊死を防ぐために血行を再開するまでのタイムリミットは1時間程度と言われており、実際の使用を想定して当初目標としていた分解速度に迫ることができた。

4. まとめ

本研究では、分解生成物が自己分解を加速するヒドロゲルを確立するべく、アミロペクチンとその分解酵素であるアミラーゼにより生じた分解生成物が脱架橋を促進するような材料設計のもと、研究を行った。その結果、アミラーゼにより迅速に分解可能なヒドロゲルを開発することに成功した。アミラーゼは生体内に存在する酵素であり、細胞培養用培地に添加する血清中にも含まれるため、三次元組織構築への応用が期待される。また、この材料の分解生成物はボロン酸修飾合成高分子と糖のみであり、前者は細胞の増殖に大きな影響を与えないことが別途行った予備実験でも確かめられている。通常、酵素のような大きな分子を用いたヒドロゲル材料の分解では、ネットワーク中に酵素が拡散していくのに時間を要する。本材料では、酵素の分解によりその場で発生した生成物自体が脱架橋を促進するため、ネットワークを「こじ開けて」加速的に分解を進めるような新たなアプローチを提案することができる。

今後は、本研究で得られた成果に基づき、分解メカニズムの詳細な解析と材料設計の最適化、種々の多糖とその分解酵素を用いた本概念の拡張を引き続き行っていく。また、実際に足場となる材料と複合化することで、再生医療に適用可能な三次元組織構築に向けた検討を進めていく予定である。

謝辞

本研究は大阪大学大学院基礎工学研究科物質創成専攻の田谷正仁教授、境慎司教授との共同研究です。

また、本研究を援助していただいた公益財団法人京都技術科学センターに感謝致します。

参考文献

[1] L. S. Nair and C. T. Laurencin, *Prog. Poly. Sci.* **32**, 762-798 (2007).

[2] S. Sakai, Y. Liu, T. Matsuyama, K. Kawakami and M. Taya, *J. Mater. Chem.* **22**, 1944 (2012).

研究成果発表

1) M. Nakahata and S. Sakai, *ChemNanoMat* **5**, 141 (2018). [Selected as Cover Feature]